卷叶贝母法尼基焦磷酸合酶FPPS基因的克隆及表达分析

李锐，陈晓仪，张阳，张甜甜，赵琦*
（成都大学 药学与生物工程学院，成都，610106）

摘要：克隆卷叶贝母（*Fritillaria cirrhosa*）中与生物碱合成途经相关的关键酶法尼基焦磷酸合酶基因（farnesyl diphosphate synthase, *FPPS*），并对其进行生物信息学分析，利用荧光定量PCR（qRT-PCR）检测其表达变化，为后续卷叶贝母*FPPS*基因功能研究打下基础。该研究基于转录组测序结果，通过PCR技术克隆川贝母*FPPS*基因（*FcFPPS*）开放阅读框（Open Reading Frame，ORF）序列，运用生物信息学方法对该基因进行分析，预测其编码蛋白的结构与功能，并通过qRT-PCR检测*FcFPPS*基因在野生鳞茎和再生鳞茎（通过激素组合刺激获得的组织培养物）中的表达情况，以及利用煎煮法测定野生鳞茎和再生鳞茎的总生物碱含量。结果表明：获得了1 059 bp的*FcFPPS* ORF片段，编码352个氨基酸，并与NCBI上公布的麝香百合、虎眼万年青、春兰等植物FPPS蛋白的相似性达85%以上；对FcFPPS蛋白的二级、三级结构预测发现FcFPPS蛋白主要由α螺旋构成；qRT-PCR与总生物碱含量测定实验表明*FcFPPS*基因的表达水平与总生物碱含量的变化趋势一致，都是再生鳞茎高于野生鳞茎。FcFPPS蛋白质特征区及同源性等生物信息学分析结合qRT-PCR的测定结果证明FcFPPS可能是一个有生物学功能的蛋白质，该研究为后续利用基因工程手段提高卷叶贝母中生物碱含量奠定了理论基础。

关键词：川贝母，法尼基焦磷酸合酶，克隆，生物信息学，基因表达
中图分类号：Q943.2　　文献标识码：A
DOI：10.11931/guihaia.gxzw201710010

[1] Cloning and expression analysis of *Farnesyl diphosphate synthase* gene in *Fritillaria cirrhosa*

LI Rui, CHEN Xiao-Yi, ZHANG Yang, ZHANG Tian-Tian, ZHAO Qi*
(*College of* Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu *University*, Chengdu 610106, China)

Abstract: Farnesyl diphosphate synthase (FPPS) is a pivotal enzyme to regulate the biosynthesis of alkaloids. In this paper, Open Reading Frame (ORF) of *Fritillaria cirrhosa* FPPS (FcFPPS) was cloned via PCR method based on RNA-Seq. Some bioinformatic methods and softwares were used for the gene structure and function analysis. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used for the analysis of gene expression between wild and regeneration bulbs. The total alkaloid content of wild and regenerated bulbs were measured by decoction method. The result showed that the *FPPS* ORF was 1059 bp, encoding 352 amino acids. NCBI Blast x search results showed that FcFPPS had the higher amino acids similarity to the corresponding proteins from *Ilium longiflorum, Ornithogalum longebracteatum,* and *Cymbidium goeringii.* The identities of FcFPPS were more than 85%. The prediction results of FcFPPS protein secondary and tertiary structure showed the FcFPPS protein was mainly composed of α helix. The *FcFPPS* RT-qPCR results were in parallel with the physiological data of accumulation of alkaloid, both showed higher alkaloid accumulation in regeneration bulbs than wild bulbs. [Conclusion]: These findings suggested FcFPPS might be a biological functional protein induced by RT-qPCR combination, which established a theoretical foundation for the improvement of the alkaloid content by the genetic engineering.

Key words: *Fritillaria cirrhosa*, Farnesyl diphosphate synthase, cloning, bioinformatics, gene expression

卷叶贝母（*Fritillaria cirrhosa*），又称川贝母，属百合科贝母属，其干燥的鳞茎是川产道地药材“川贝母”的最珍贵来源，主产川西、滇西北和藏东、藏南3200~4200 m的高海拔区域(中国植物志编委会, 1998)。卷叶贝母是2010年版的《中华人民共和国药典》中药材“川贝母”6种来源植物之一(国家药典委员会, 2010)，通常被认为是其中药效最好，最为珍贵的来源植物。其干燥的鳞茎中含有多种核苷(Duan et al, 2011)、生物碱(王晓静, 2004)和挥发油(Wang & Li, 2013)等药效物质，具有清热润肺，化痰止咳的功效，主治肺热燥咳，咯痰带血，痰多胸闷等症，并具有抗炎，抗高血压，抗肿瘤和心血管疾病的效果(Wang et al, 2011)。

甾类生物碱是卷叶贝母的主要药效成分(王强等, 2002)，其干燥鳞茎中富含的川贝碱、西贝碱、贝母素乙和贝母素甲等甾类生物碱都可以显著的抑制小鼠由氨引起的咳嗽等症状(Wang et al, 2011)。甾类生物碱的生物合成比较复杂，研究表明其生物合成途径与三萜类化

1收稿日期：2017-10-10
基金项目：国家自然科学基金（31600261）；四川省教育厅自然科学重点项目（17ZA0078）[Supported by the Natural Science Foundation of China（31600261）；Sichuan Provincial Department of Education Natural Science Key Project（17ZA0078）]。
作者简介：李锐（1986-），男，山西昔阳人，博士，讲师，主要从事药用植物生物化学与分子生物学方面的研究，（E-mail）lirui1986523@163.com。
*通信作者：赵琦，博士，副教授，研究方向为药用植物分子生物学，（E-mail）zhaoqi@cdu.edu.cn。

合物类似，主要由甲羟戊酸途径（MVA）合成，该途径中的法尼基焦磷酸合酶催化两分子的异戊烯基焦磷酸和一分子的二甲基丙烯基焦磷酸完成 1,4 头尾缩合反应生成法呢基焦磷酸（FPP），而 FPP 是生物合成萜类化合物、类固醇、甾类等的共同前体(李永波 等, 2012)，因此，作为甾类生物碱合成途径的重要限速酶，FPPS 的含量与活性必将决定后续次生代谢产物的产量。针对植物次生代谢途径的研究，关键酶基因的克隆与功能分析一直是其研究热点。目前已经从多种植物中克隆并鉴定了 *FPPS* 基因，包括杜仲、三七、刺五加等(李永波 等, 2012)，在这些

物中 FPPS 是一个 80-84kD 的同型二聚体，该二聚体构型最显著的结构特性就是由 10 个核心螺旋围绕着的较大的中心空腔，每个亚基都存在两类底物结合位点，亚基之间的相互作用形成了二聚体共享的活性中心(Tanetoshi et al, 2000)。经研究表明，*FPPS* 基因的异源表达可以明显提高青蒿(Chen et al, 1999)、烟草(Cui et al, 2006)等植物中经由该途径合成的相关次生代谢产物的含量。可见，*FPPS* 对植物次生代谢产物的合成具有重要的调控作用。

为了探究卷叶贝母 *FPPS* 基因是否参与甾类生物碱合成、萜类合成等代谢过程，为甾类和三萜类化合物代谢途径提供优质基因资源，本研究首先运用分子生物学技术克隆了卷叶贝母 *FPPS* 基因，并运用生物信息学手段对其序列进行分析以预测其所具有的生物学功能，随后分别通过 qRT-PCR 技术和煎煮法检测了再生鳞茎和野生鳞茎基因表达和总生物碱含量的变化趋势。这些工作均为深入研究卷叶贝母 *FPPS* 基因的功能及利用提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料：卷叶贝母野生材料采自其原产地康定折多山川贝母野生抚育基地，经组织培养技术快速繁殖得到大量供实植株。再生鳞茎诱导采用 MS+2.0 $mg\cdot L^{-1}$ 6-BA +0.5 $mg\cdot L^{-1}$ NAA 在 20 °C 的光照培养（40 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$ 光照 12 h）条件下培养 2 个月获得。

试剂：大肠杆菌菌株 Top10 由本实验室保存，反转录试剂盒（Prime-Script RT reagent Kit）、pfu 高保真酶、pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司，琼脂糖凝胶回收试剂盒、总 RNA 提取试剂盒购自天根生化（北京）科技有限公司，质粒提取试剂盒购自 Omega 公司（Omega，USA），荧光定量试剂盒（SsoFast^{tm} EvaGreen® Sapermix）购自 BIO-RAD 公司，其它化学药品为进口或国产分析纯，PCR 引物合成和基因测序由北京六合华大基因有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

用天根公司的植物总 RNA 提取试剂盒提取卷叶贝母野生鳞茎和再生鳞茎的总 RNA，并按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链，反转录产物保存于-80 ℃备用。基于转录组测序分析，较野生鳞茎相比，再生鳞茎的 *FPPS* 基因表达量增高，因此将再生鳞茎样品用于 *FcFPPS* 基因的克隆。

1.2.2 *FcFPPS* 基因的克隆与序列分析

根据本实验室测得的卷叶贝母转录组测序数据库，用 primer primier 5.0 软件设计基因特异性引物。上游引物：5′-ATGGCGGCGGCGGCGG-3′，下游引物：5′-CTACTTCTGCCTCTTGTAAATCTTG -3′，以反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。所得产物经回收后克隆到 pMD19-T 载体上，转化 *E. coli* Top10 感受态细胞。菌落经 PCR 验证后，挑取阳性菌落送往北京六合华大基因有限公司进行测序分析。

将克隆的 *FcFPPS* 基因编码区翻译成氨基酸序列，用 NCBI 网站的 Blastp 工具(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) 进行蛋白质同源性搜索；采用 DNAMAN 6.0 软件，对目前已经克隆 *FPPS* 的代表性植物进行氨基酸序列同源性比对；用 MEGA 5.1 软件构建分子进化树；用 ExPASy 在线服务器的 ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/) 对 FcFPPS 蛋白质结构特点进行基本理化性质分析；分别采用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODE (http://swissmodel.expasy.org/)在线分析软件对 FcFPPS 蛋白二级、三级结构进行预测分析。

1.2.3 卷叶贝母基因表达量及总生物碱含量分析

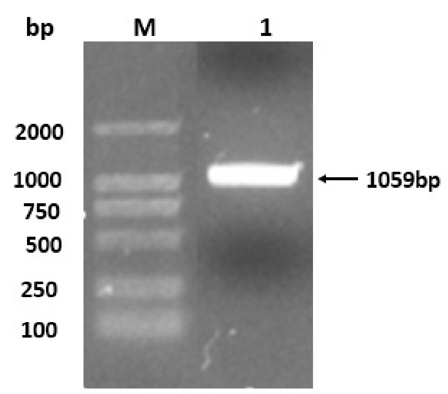
以卷叶贝母 *18S* 基因 (AY616727.1)为内参，利用 primer primier 5.0 软件设计 qRT-PCR 扩增引物(FcFPPS-F: 5′-ATTTCAAGTGTTCCTGGCTCA-3′;

FcFPPS-R: 5′-ACCCTCATACTCCGCAAATAC-3′; Fc18S-F:5′-TACGACTCTCGGCAACGGA-3′;Fc18S-R: 5′-CAAAGGGGCAATGGGAACA-3′)，以 2.2.1 中合成的各样品 cDNA 稀释 50 倍为模板，采用 SsoFast™ EvaGreen® Sapermix 试剂盒进行 qRT-PCR 检测，每组样品做 3 个平行重复，做 3 次生物学重复，所得数据按 Bubner et al（2004）的 Ct（$2^{-\Delta\Delta Ct}$）法计算目的基因的相对表达量。卷叶贝母鳞茎总生物碱含量测定，参照王跃华等（2015）的煎煮法利用紫外分光光度仪进行测试，每组平行制备 3 份样品，同法重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 *FcFPPS* 基因的克隆与生物信息学分析

依据卷叶贝母转录组测序数据设计引物，通过 PCR 技术克隆得到 *FcFPPS* 基因（MG674920）ORF 序列长 1059 bp（图 1），编码蛋白含有 352 个氨基酸残基，理论分子量为 40.1 KDa，理论等电点 PI 为 5.1。将 *FcFPPS* 基因推测的氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blastp 搜索发现：FcFPPS 推测蛋白与麝香百合（*Lilium longiflorum*，ADZ57167.1），虎眼万年青（*Ornithogalum longebracteatum*，AHA51120.1），春兰（*Cymbidium goeringii*，AFP19446.1），海枣（*Phoenix dactylifera*，XP_008792798.1）等植物的 FPPS 蛋白相似性达 85%以上。



注：M.DL2000 maker； 1. *FcFPPS* PCR 片段
Note: M.DL2000 marker; 1.Fragment containing *FcFPPS* gene
图 1 *FcFPPS* 基因 ORF 的克隆
Fig.1 Clone of *FcFPPS* ORF

用 DNAMAN 6.0 软件进行同源比对，从图 2 可以看出，FcFPPS 蛋白具有植物 FPPS 蛋白高度保守的 5 个结构域，I-V，其中具有酶活催化和底物结合位点的富含天冬氨酸基序位于区域 II 和 V(Tarshis et al, 1994)。在 Blastp 分析的基础上，根据 8 种植物 *FcFPPS* 基因的氨基酸序列同源性，用 MEGA5.1 软件作出系统进化树。图 3 显示，进化树聚为单子叶和双子叶两类，卷叶贝母与同为被子植物门单子叶植物纲百合科的麝香百合、虎眼万年青 FPPS 蛋白亲缘关系较近。

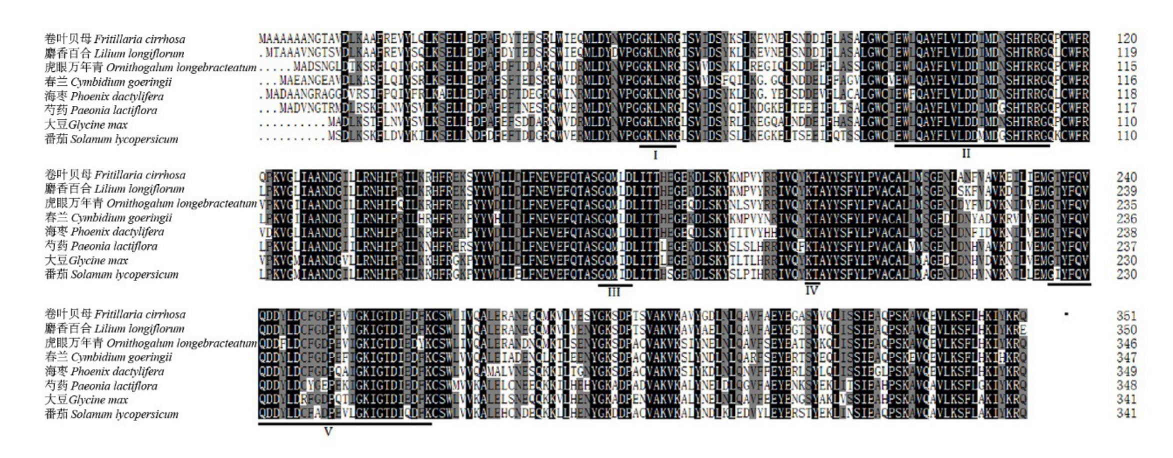


图 2 FcFPPS 与其它植物 FPPS 氨基酸序列比对分析
Fig.2 Amino acid sequence alignment of the FcFPPS with FPPS from other plants

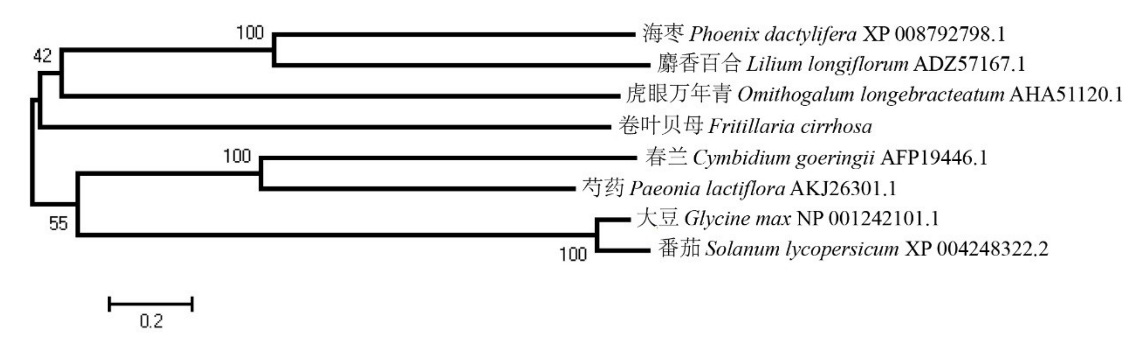


图 3 卷叶贝母 FcFPPS 蛋白与其他植物中 FPPS 蛋白序列的进化分析
Fig.3 Phylogenetic tree of FPPS protein of *Fritillaria cirrhosa* and other plants

分别采用 SOPMA 和 SWISS-MODE 在线分析软件对 FcFPPS 氨基酸序列的二级、三级结构进行预测，结果显示（图 4），FcFPPS 蛋白的二级、三级结构中含有大量的 α-螺旋（59.66 %）和

规则卷曲（22.73 %），表明 α-螺旋及不规则卷曲是其整体蛋白质结构中的主要组成结构元件，此外，β-转角和延伸链散布于整个蛋白质中。通过 SWISS-MODE 进行三级结构的同源建模，找到 FcFPPS 的同源模型 PDB：4kk2.1.A，它的三维结构通过 X-ray 被测定出来。经过比对，FcFPPS 和 4lzi.1.A 的氨基酸序列一致性高达 75.81 %。

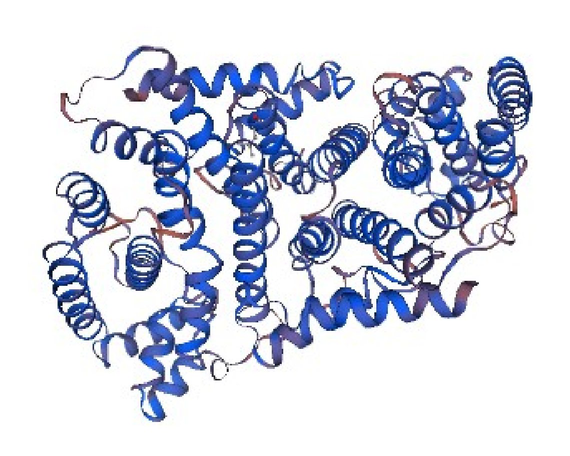
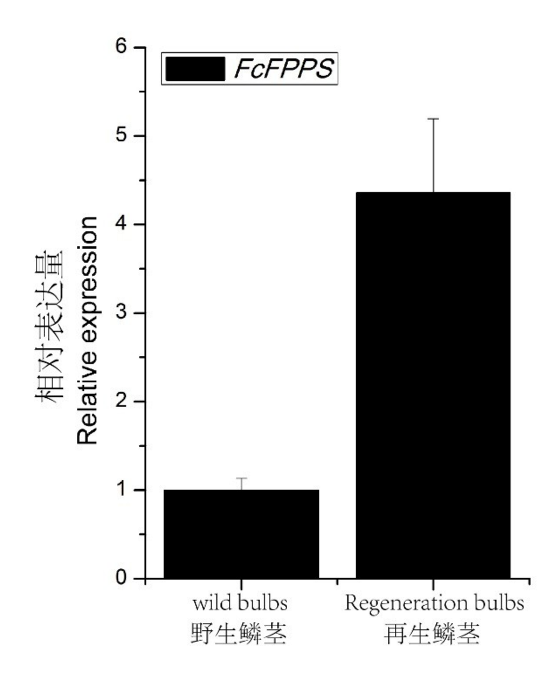


图 4 FcFPPS 蛋白的三级结构预测
Fig.4 Tertiary structure analysis of deduced FcFPPS protein

2. 2 *FcFPPS* 基因表达量变化分析

基于构建的卷叶贝母野生鳞茎和再生鳞茎转录组表达量分析，检测出一条法尼基焦磷酸合酶相关 unigene 0037411，RPKM（Reads Per Kilobases per Millionreads）值分别对应野生鳞茎为 29.93，再生鳞茎为 44.97。为了进一步证明该基因在野生鳞茎和再生鳞茎中差异表达，利用 qRT-PCR 技术检测该基因在两者间的表达情况，结果见图 5，*FcFPPS* 基因在野生鳞茎和再生鳞茎中的表达量变化趋势一致（再生高于野生），以野生鳞茎作为校对样本 BA+NAA 激素的诱导再生鳞茎可以使 *FcFPPS* 基因表达量提高到接近 5

，由于再生鳞茎是经过激素诱导形成，因此该基因在再生鳞茎的高表达暗示其很有可能是 BA+NAA 激素组合在其中的诱导所致，说明该激素组合对其具有一定的正调控效应。



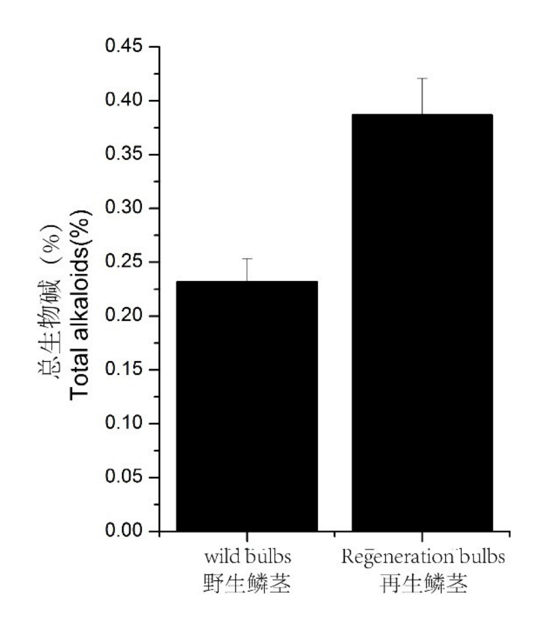
注：**表示 t-test 差异非常显著(P<0.01)

Note: **The t-test value of correlation is below 0.01 means very significant correlation

图 5 野生鳞茎和再生鳞茎中 *FcFPPS* 基因表达量的变化

Fig.5 Relative expression of *FcFPPS* in wild and regeneration bulbs

采用煎煮法提取卷叶贝母野生鳞茎和再生鳞茎的总生物碱并测定其含量，分析结果如图 6 显示，可以看出通过激素诱导获得的再生鳞茎总生物碱含量约为 0.37%，而野生鳞茎总生物碱含量约为 0.23%。再生鳞茎与野生鳞茎相比，其总生物碱含量增高，推测 BA+NAA 激素组合通过诱导 *FcFPPS* 基因高水平表达在再生鳞茎生物碱的积累过程中发挥着重要作用。



注：**表示 t-test 差异非常显著(P<0.01)

**The t-test value of correlation is below 0.01 means very significant correlation

图 6 卷叶贝母野生鳞茎与再生鳞茎的总生物碱含量

Fig.6 Total alkaloid contents of Wild and Regeneration in *Fritillaria cirrhosa*

3 讨论

卷叶贝母*FPPS*基因的克隆是基于其野生状态下的鳞茎与通过组织培养获得的再生鳞茎的转录组测序结果比对为基础，发现一条与生物碱、萜类生物合成相关的差异表达unigene，通过克隆获得其ORF序列。经生物信息学结构分析发现卷叶贝母FPPS蛋白与其他植物的FPPS蛋白具有较高的相似性，并且在三维结构上的功能域与其它物种完全相符(邢朝斌 等, 2012)，初步说明卷叶贝母FPPS蛋白可能是一个在生物碱、萜类生物合成过程中起作用的功能蛋白。

卷叶贝母野生鳞茎与再生鳞茎转录组测序*FPPS* unigene的RPKM值与qRT-PCR的变化趋势一致，都是再生鳞茎中该基因的相对表达量发生显著上调，同时结合总生物碱含量的比较分析发现，*FcFPPS*基因的表达量与总生物碱含量的变化也完全一致，说明*FPPS*基因可能参与了卷叶贝母总生物碱的合成，这进一步证实了通过组织培养技术获得的贝母再生鳞茎能有效的提高生物碱含量这一事实(朱丹妮等, 1992; 陈敏等, 1995)。

组织培养是在人工气候条件下通过植物激素诱导来实现的。卷叶贝母的再生鳞茎（组织培养物）表现出的高生物碱含量可能与生长条件和激素刺激相关，这些因子可能通过基因调控网络控制生物碱的合成。在卷叶贝母生物碱生物合成途径中，FPPS的催化是重要的酶促步骤，对该基因进行研究，将有助于揭示贝母生物碱类物质合成的分子机制，具有重要的理论价值，后期将通过原核与真核表达系统，利用超表达和基因敲除的形式控制基因表达，进一步确定*FcFPPS*基因的功能。

参考文献

BUBNER B, BALDWIN IT, 2004. Use of real-time pcr for determining copy number and zygosity in transgenic plants [J]. Plant Cell Rep, 23(5): 263-271.

CHEN DH, LIU CJ, YE HC, et al, 1999. Ri-mediated transformation of artemisia annua with a recombinant farnesyl diphosphate synthase gene for artemisinin production[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 57(3): 157-162.

CHEN M, CHEN HR, ZHONG FL, et al, 1995. Tissue culture of bulbus *Fritillariae cirrhosae*[J]. Chin J Chin Materia Med, 20(8): 461-462. [陈敏，陈和荣，钟凤林，等，1995. 川贝母组织培养的研究[J]. 中国中药杂志, 20(8): 461-462.]

CUI H, LIU HJ, JUN XL, 2006. Expression of foreign farnesyl diphosphate synthase gene in transgenic tobacco enhances disease resistance to alternaria alternata *in vitro*[J]. Acta Agron Sin, 32(6): 817-820. [崔红，刘海礁，李雪君，2006. 转外源法尼基焦磷酸合酶基因烟草抗赤星病研究[J]. 作物学报，32(6): 817-820.]

DUAN B, WANG L, DAI X, et al, 2011. Identification and quantitative analysis of nucleosides and nucleobases in aqueous extracts of D. Don. using hplc–dad and hplc-esi-ms[J]. Anal Lett, 44(15): 2491-2502.

LI YB, FAN QQ, WANG BL, et al, 2012. Advances in the study of plant farnesyl pyrophosphate synthase genes[J]. J Agric Biotechnol, 20(3): 321-330. [李永波，樊庆琦，王宝莲，等，2012. 植物法呢基焦磷酸合酶基因(fpps)研究进展[J]. 农业生物技术学报, 20(3): 321-330.]

NATIONAL PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2010. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Part 3) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press. [国家药典委员会, 2010. 中华人民共和国药典(第3部) [M]. 北京：中国医药科技出版社.]

TARSHIS LC, YAN M, POULTER CD, et al, 1994. Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-a resolution[J]. Biochemistry-USA, 33(36): 10871-10877.

TANETOSHI K, YUKIO GA, NISHINO T, 2000. Intersubunit location of the active site of farnesyl diphosphate synthase: reconstruction of active enzymes by Hybrid-type heteromeric dimers of site-directed mutants [J]. Biochemistry-USA, 39(2):463-469.

WANG, D, ZHU J, WANG S, et al, 2011. Antitussive, expectorant and anti-inflammatory alkaloids from bulbus *Fritillariae cirrhosae*[J]. Fitoterapia, 82(8): 1290-1294.

WANG Q, LAN LQ, FU HL, 2002. Induction of polyploid from colchicine-treated *Fritillaria cirrhosa* D. Don callus[J]. J Bot Res, 20(6): 449-452. [王强，兰利琼，傅华龙，2002. 秋水仙素诱导川贝母愈伤组织多倍体的研究[J]. 植物科学学报, 20(6): 449-452.]

WANG X, LI Y, 2013. Analysis of volatile oil of fritillaria cirrhosa d. Don by gc-ms[J]. Asian J Chem, 25(6): 3252-3254.

WANG XJ, 2004. Study on alkaloid composition and quality of *Fritillaria cirrhosa* D.Don [D]. Chengdu, Sichuan University:1-68. [王晓静, 2004. 川贝母生物碱成分与品质研究[D]. 成都，四川大学：1-68.]

WANG YH, XU EQ, GUO CP, et al, 2015. Study on extraction of total alkaloids from *Fritillaria cirrhosa* D.Don [J]. J Chengdu Univ (Nat Sci Ed), 34(2): 108-110. [王跃华，徐恩琴，郭翠平，等，2015. 煎煮法提取卷叶贝母组培物总生物碱研究[J]. 成都大学学报(自然科学版), 34(2): 108-110.]

XING CB, LONG YH, HE S, et al, 2012. Molecular cloning of farnesyl diphosphate synthase from eleutherococcus senticosus and its bioinformatics and expression analysis [J]. Chin J Chin Mat Med, 37(12): 1725-1730. 邢朝斌，龙月红，何闪，等，2012. 刺五加法尼基焦磷酸合酶基因的克隆、生物信息学及表达分析[J]. 中国中药杂志, 37(12): 1725-1730.

ZHANG HD, REN SX, 1998. Chinese Flora. Beijing: Science Press, 49（3）:53-91. [张宏达，任善湘，1998. 中国植物志. 北京：科学出版社，49（3）:53-91.]

ZHU DN, JIANG Y, CHEN T, et al, 1992. Research on chemical components and primary pharmaceutical actions of cultured bulb of *Fritillaria cirrhosa* D.Don [J]. J Chin Pharmac Unive, (2): 118-121. [朱丹妮，蒋莹，陈婷 等，1992. 组织培养川贝母化学成分和药理作用的研究[J]. 中国药科大学学报(2): 118-121.]